1776

ПАСПОРТ-ИНСТРУКЦИЯ
к использованию аппарата для вертикального гель-электрофореза

«Хийу Калур»

1. НАЗНАЧЕНИЕ ПРИБОРА

Аппарат для электрофореза в вертикальных пластинах геля предназначен для разделения в полиакриламидном, агарозном или крахмальном геле высокомолекулярных соединений, преимущественно биополимеров — белков и нуклеиновых кислот, подвижных в электрическом поле, при проведении анализов или исследований в медицине, биологии и других областях.

Аппарат обладает высокой разрешающей способностью, а чувствительность в пересчете на одну фракцию составляет 0,1—10 нг, в зависимости от метода проявления фореграмм.

Прибор обеспечивает проведение электрофореза в лабораторных условиях при температуре от 0 °С до 35 °С с относительной влажностью 80% при 25 °С.

2. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Прибор обеспечивает одновременное проведение электрофореза в двух или одной гелевой пластинах размером как 115×115×1; 2; 3 мм (пробег 115 мм), так и 115×55×1; 2; 3 мм (пробег 55 мм). В каждом геле можно вести разделение 13 проб.

Максимально допустимое напряжение 250 В, максимально потребляемая мощность не более 6 В·А на одну пластинку длиной 115 мм и толщиной 1 или 2 мм и 9 В·А на одну пластинку длиной 115 мм и толщиной 3 мм. Для работы с аппаратом годится любой источник питания, стабилизирующий постоянный ток по напряжению, по току или по мощности (например, УИП или электронный блок от приборов ПЭФА-1, ПЭФА-3 или ИПЭ-600-0,5 Мукачевского завода комплектных лабораторий).

Габариты прибора: ширина 155 мм, высота с крышкой 190 мм, длина 200 мм.

3. В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ ПРИБОРА ВХОДЯТ:

— камера для электрофореза в 2-х пластинах геля размером 115×115×1 мм	1 шт.
— запасные части и принадлежности:	
— стеклянные пластинки размерами 124×132×3 мм	2 шт.
—"— 124×132×4 мм	2 шт.
—"— 75×132×3 мм	2 шт.
— ограничители толщины геля («спейсеры») 1 мм	2 шт.
—"— 2 мм	6 шт.
—"— 3 мм	6 шт.
— шаблоны-гребешки для геля 1 мм	2 шт.
—"— 2 мм	4 шт.
—"— 3 мм	4 шт.
— трубчатая прокладка длиной 350 мм	2 шт.
— плосковидная прокладка длиной 1800 мм	1 шт.
— штифт с поперечным отверстием	2 шт.
— прутик с резьбой М3 30 мм	2 шт.

УСТРОЙСТВО И ПРИНЦИП РАБОТЫ

В основу строения прибора положена идея вертикального расположения геля между электродными буферными отсеками, находящимися рядом друг с другом. Подобное строение обеспечивает компактность аппарата, простоту термостатирования геля и гидростатическое равновесие его с буферными растворами.

Аппарат для электрофореза в вертикальных пластинах геля (рис. 1) включает корпус 1, две одинаковые створки 2, формирующие в собранном приборе торцевые электродные отсеки, две одинаковые разборные гелевые ячейки 3, вставку 4, формирующую в собранном приборе центральный электродный буферный отсек, зажимную колодку 5, зажимной болт 6, два съемных торцевых электрододержателя 7, один съемный центральный электрододержатель 8, погружаемые термостатирующие спирали 9, 10, 11 (для переднего, среднего и заднего отсека, соответственно) и крышку прибора 12.

Основной рабочий элемент аппарата — гелевая ячейка (рис. 2 и 3) — включает опорную раму 13, лицевую («нижнюю») стеклянную пластину толщиной 3 мм — 14, заднюю («верхнюю») стеклянную пластину 15 толщиной 3, 4 или 5 мм, ограничители толщины геля («спейсеры») 16 на 1, 2 или 3 мм (суммарная толщина «спейсера» и задней стеклянной пластинки равна 6 мм), шаблон-гребешок 17 для формирования 13 карманов для анализируемых проб на поверхности геля: гребешки рассчитаны для формирования карманов в 1, 2 или 3 мм геле, эластичные трубчатые прокладки 18, 19, 20 для герметизации гелевой ячейки (18 — длинная прокладка, вдавливаемая с внешней стороны лицевой стеклянной пластинки в желобок, 19 — две короткие прокладки, вдавливаемые по бокам под рант со сторон задней стеклянной пластинки, 20 — длинная прокладка, вдавливаемая с внешней стороны задней стеклянной пластинки за рант опорной рамы).

Для крепления электродов 22 (см. рис. 4) к электрододержателю в нижних углах погружаемых в буфер пластинок выполнены горизонтальные каналы 21 для вставления в один из них места спайки электрода с подводящим ток изолированным проводом, а в другой — свободного конца электрода, продетого через отверстие в штифте 23. Для фиксации в каналах с одной стороны места спайки электрода с токоподводящим проводом и с другой стороны штифта с прикрепленным свободным концом электрода снизу по углам в плоскости погружаемой пластинки электрододержателя проделаны каналы с резьбой 24, в которые вкручены фиксирующие шурупы 25. Для предотвращения электрического контакта места спайки и медного подводящего провода с электродным буфером каналы перед установлением электродов и фиксирующих шурупов заполняют изолирующей смазкой, например, вакуумной смазкой типа «Апиезон».

Каждая термостатирующая спираль поддерживается скобой 26, уровень спирали в скобе фиксируется с помощью резиновых колечек 27. Отдельные спирали соединены между собой кусочками резинового шланга 28.

Токоподводящие провода присоединяются к источнику питания с помощью штепсельных штырьков 29, 30, 31. Для подсоединения к одному штепсельному гнезду источника питания двух штепсельных штырьков аппарата 30 и 31, подающих ток на два торцевых электродных буферных отсека в корпусе одного из них имеется отверстие для поперечного присоединения к нему другого штепсельного штырька.

Для обеспечения герметичного присоединения гелевой ячейки к буферным отсекам как створки так и вставка снабжены эластичными торцевыми прокладками — 32.

Принцип работы основан на свойстве различных высокомолекулярных соединений, частицы которых имеют собственный заряд, разделяться на составляющие фракции под действием электрического поля, возникающего между электродами, опущенными в буферный раствор.

5. УКАЗАНИЕ МЕР БЕЗОПАСНОСТИ

Категорически запрещается касаться буферных растворов, находящихся под напряжением!

При работе с химическими реактивами необходимо соблюдать меры предосторожности, учитывая их токсичность (фенол, мертиолят, акриламид, метиленбисакриламид, этилендиакрилат), агрессивность (уксусная, муравьиная кислота).

6. ПОДГОТОВКА ПРИБОРА К РАБОТЕ

6.1. Прибор для электрофореза должен быть защищен от воздействия солнечных лучей и других источников тепла. Категорически запрещается очищать прибор органическими растворителями, как хлороформ, дихлорэтан, ацетон, толуол. Исключение составляют стеклянные пластинки.

6.2. Сборка гелевой ячейки (см. рис. 2):

Стеклянная пластинка размером 124×132 мм толщиной 3 мм вставляется в желобок рамы широкой стороной (операция 1* рис. 2). В желобок с внешней стороны вставленной в нее стеклянной пластинки по бокам и снизу вдавливается эластичная трубчатая прокладка (операция 2* рис. 2). Внимание! Следите за тем, чтобы прокладка не заходила за край стеклянной пластинки и чтобы в углах прокладка не была слишком растянута — в последнем случае в процессе заливки геля ячейки могут разгерметизироваться.

В зависимости от выбранной толщины геля подбирают «спейсеры» и заднюю («верхнюю») стеклянную пластинку. Их суммарная толщина равняется 6 мм. Дальнейшую сборку лучше осуществлять при горизонтальном положении опорной рамы (установленной прокладкой вниз). «Спейсеры» кладут вдоль боковых стенок опорной рамы так, чтобы «стопа» спейсера была направлена вверх. Заднюю пластинку вдвигают по «спейсерам» под рант до упора (в стопу спейсера), а по бокам вдавливают вначале вручную, а затем «ножом» две короткие эластичные прокладки. Зазор между дном опорный рамы и нижним краем «задней» стеклянной пластинки определяется толщиной «стопы», равной толщине «спейсера». И, наконец, за рант по бокам и снизу с внешней стороны задней стеклянной пластинки вдавливают длинную эластичную прокладку, следя за тем, чтобы она не заходила снизу за край стеклянной пластинки.

Внимание! В случае выхода из строя приложенных эластичных прокладок, они могут быть заменены катетерами № 10 или № 11 из красной резины.

Внимание! В некоторых случаях для лучшей герметизации, а также для облегчения вдавливания прокладок в желобок и за рант опорной рамы с внешней стороны стекол прокладки рекомендуется смазать вакуумной смазкой типа «Апиезон» или техническим вазелином.

В герметизированную таким образом гелевую ячейку, установленную в вертикальное положение вливают гелеобразующую жидкость. В случае работы без концентрирующего геля шаблон для формирования «карманов» для образцов устанавливается сразу. При этом для избегания застревания пузырьков воздуха под зубцами шаблона рекомендуем заполнить гелевую ячейку гелеобразующей смесью до верхнего края лицевой («нижней») стеклянной пластинки и лишь затем установить шаблон. Излишек гелеобразующей смеси можно удалить фильтровальной бумагой. Если же предполагается вести электрофорез с предварительной концентрацией образцов, т. е. с концентрирующим гелем, то верхний уровень разделяющего геля должен быть на 15—20 мм ниже верхнего края лицевой пластинки. При этом на незаполимеризовавшуюся смесь мономеров необходимо нанести слой дистиллированной воды или гелевого буфера. Лучше всего наслаивать воду или буфер либо с помощью перистальтического насоса через капилляр при медленной подаче, либо с помощью прямоугольного куска предварительно смоченной фильтровальной бумаги, нижний край которой соприкасается со смесью гелеобразующей жидкости, а верхний край свешивается через край задней стеклянной пластинки. В последнем случае воду можно нанести из 1—2 мл пипетки, водя хорошо оттянутым ее кончиком по фильтровальной бумаге от края к краю чуть ниже перегиба с лицевой стороны. После нанесения слоя воды бумагу следует либо осторожно удалить, либо приподнять так, чтобы она не соприкасалась со слоем нанесенной воды.

После формирования ровной верхней границы разделяющего геля незаполимеризовавшуюся жидкость удаляют. Лучше всего это сделать с помощью фильтровальной бумаги. Оптимальное время полимеризации — 30 минут. Полимеризационную смесь концентрирующего геля заливают на разделяющий гель опять же до края лицевой стеклянной пластинки и вводят шаблон.

Внимание! В результате полимеризации конечный объем геля будет несколько меньше исходного объема мономеров, поэтому в каждом конкретном случае необходимо установить объем полимеризационной смеси как разделяющего геля, так и концентрирующего. В среднем рекомендуемая высота слоя концентрирующего геля составляет 5—6 мм.

После окончания полимеризации разделяющего и концентрирующего геля трубчатую прокладку со стороны задней стеклянной палстинки извлекают для того, чтобы в дальнейшем обеспечить электрический контакт геля с «нижним» электродным буфером (см. рис. 3).

На рис. 3 показана собранная гелевая ячейка в рабочем состоянии, т. е. после удаления длинной прокладки со стороны задней стеклянной пластинки.

6.3. Сборку прибора осуществляют следующим образом:

Детали прибора вставляют в корпус в следующем порядке. Створки для формирования переднего и заднего торцевого отсека и вставку для формирования центрального отсека складывают в корпус, при этом зажимная колодка должна быть установлена в корпусе вогнутой частью к зажимному болту. После этого устанавливают собранные гелевые ячейки с заполимеризованными гелями между створками и вставкой.

Гелевые ячейки располагают в приборе в зеркальной симметрии. Если Вы не заменили приложенных электродов из нержавеющей стали или у Вас только центральный электрод из платины, то следует всегда собирать прибор так, чтобы торцевые отсеки всегда были катодными. Поэтому, если белки движутся вниз к аноду, то гелевые ячейки повернуты друг к другу задними стеклами, а если наоборот — то, соответственно, лицевыми стеклами.

Внимание! Следите за тем, чтобы при установке гелевых ячеек не были смещены торцевые прокладки у створок и вставки.

Затяните сначала слегка зажимным болтом детали устройства, следя за тем, особенно, чтобы края вставки с эластичными прокладками попадали на торцевые плоскости опорной рамы гелевой ячейки. После необходимых поправок окончательно затяните болт.

Внимание! Не следует применять слишком больших усилий при закручивании зажимного болта. Если прокладки на створках и вставке установлены правильно, то для герметичного сжатия деталей прибора вполне достаточно усилия порядка 5—7 кг. Поэтому перед началом работы с прибором эти прокладки следует удалить, слегка смазать вакуумной смазкой типа «Апиезон» или техническим вазелином, установить их в желобки как можно ровнее. Лишнюю смазку после этого следует удалить.

После достижения герметичного прижатия деталей друг к другу устанавливают электрододержатели и в электродные отсеки наливают буфер, принимая во внимание объем, занимаемый термостатирующими спиралями. Конечный уровень буфера должен быть таким, чтобы во время работы верхняя часть геля контактировала с «верхним» электродным буфером, т. е. уровень буфера должен быть на 2—3 мм выше края лицевой стеклянной пластинки.

Перед нанесением образцов «карманы» в геле заполняют электродным буфером, а образцы наносят на гель под слой буфера. Для этого в образцы вводят для увеличения их плотности сахарозу, глицерин или в некоторых случаях, мочевину.

После нанесения образцов в буферные отсеки вставляют термостатирующие спирали (если в этом есть необходимость), устанавливают крышку прибора и подключают ток. Ввод образцов в гель следует осуществлять при мощности в 2—5 раз меньшей, чем требуется для ведения фореза. Ввод образцов можно считать законченным, когда реперный краситель вошел в гель на 1—2 мм. Сам процесс электрофоретического разделения ведут при мощности порядка 5 вт/гель. Например, при электрофорезе белков в буфере, содержащем додецилисульфат натрия (по Лэммли, 1971) для нормального разделения в 2 мм геле требуется напряжение примерно 100 В и 40 мА/гель. В таких условиях отвод тепла за счет испарения воды из электродных буферных отсеков столь эффективен, что температура буферных растворов к концу разделения лишь на 2—4° превышает температуру воздуха в помещении. При работе с термолабильными белками в помещении с температурой 18—25° следует применять термостатирующую систему, через которую можно пропустить либо водопроводную воду, либо охлаждающую жидкость из ультратермостата.

Внимание! При использовании водопроводной воды следите за тем, чтобы поток воды не был слишком сильным. В ином случае может прорвать места соединения спиралей.

Процесс электрофоретического разделения можно считать законченным, когда полоса реперного красителя, указывающего на движение фронта буфера достигла нижнего края геля.

После этого буферные растворы сливают, зажимный болт раскручивают и гелевые ячейки извлекают из прибора. Для извлечения геля ячейку полностью разбирают: извлекают трубчатые эластичные прокладки, вытаскивают из опорной рамы стеклянные пластинки с расположенным между ними гелем и «спейсерами». Осторожно вынимают «спейсеры» и стеклянные пластинки отслаивают от геля. Для этого лучше всего ввести под стекло на поверхность геля воду тонкой иглой из шприца. От другой стеклянной пластинки гель отслаивается уже легко.

Если предполагается работать с одной гелевой ячейкой, то для сборки прибора зажимную колодку переворачивают вогнутой частью от болта, используются только створки для формирования торцевых электродных отсеков и одну гелевую ячейку. От термостатирующей системы снимают заднюю спираль и используют только две оставшиеся, если платиновый электрод прикреплен только к центральному электрододер-

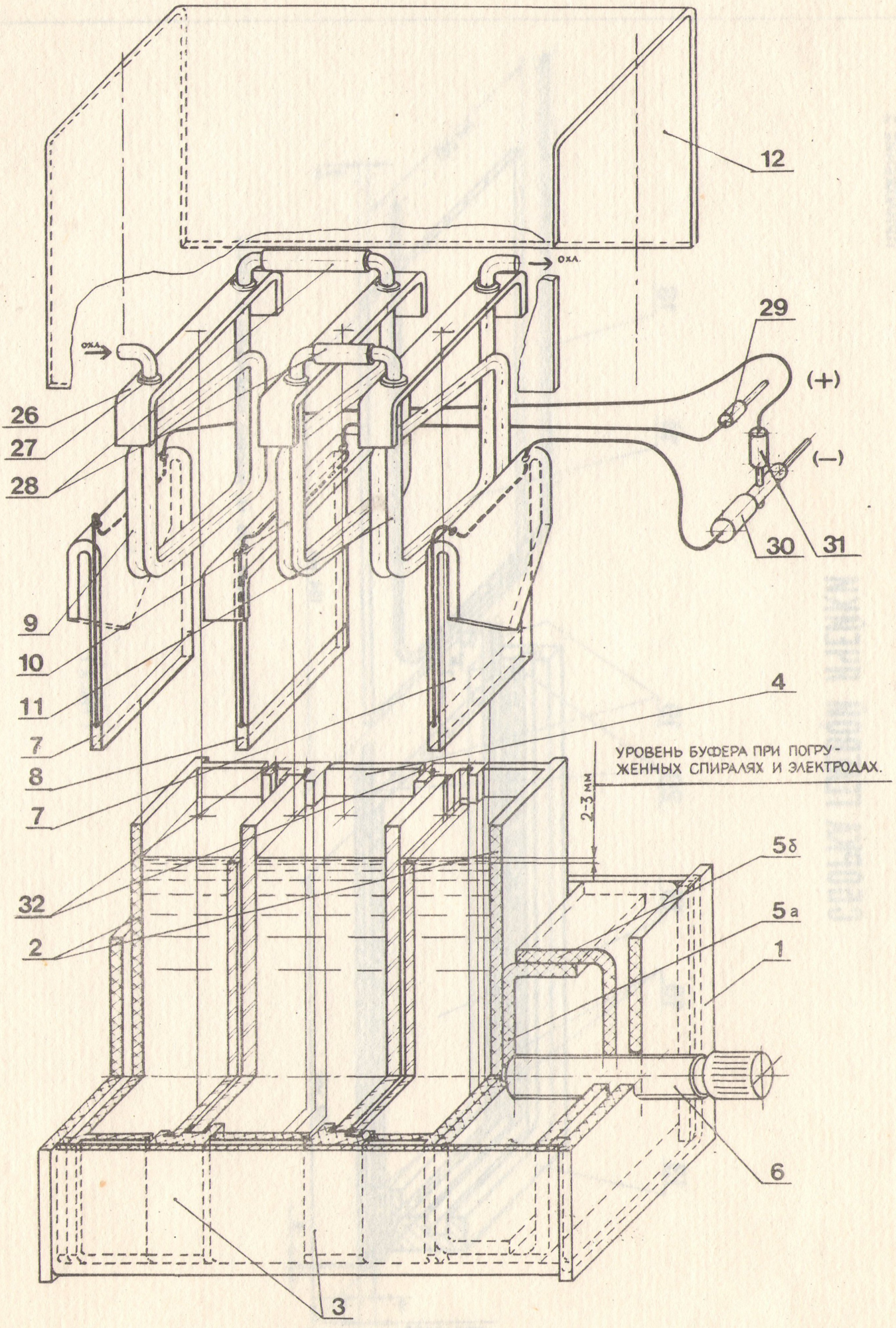
жателю, то его используют в качестве анода. Остальные операции осуществляются как описано ранее.

Прибор снабжен также короткими лицевыми стеклянными пластинками размером 75×132×3 мм, что позволяет собирать гелевую ячейку высотой 67—69 мм, в которой можно заливать гели высотой примерно 55 мм.

В связи с тем, что прибор постоянно совершенствуется, образцы его могут несколько отличаться от описанного в инструкции.

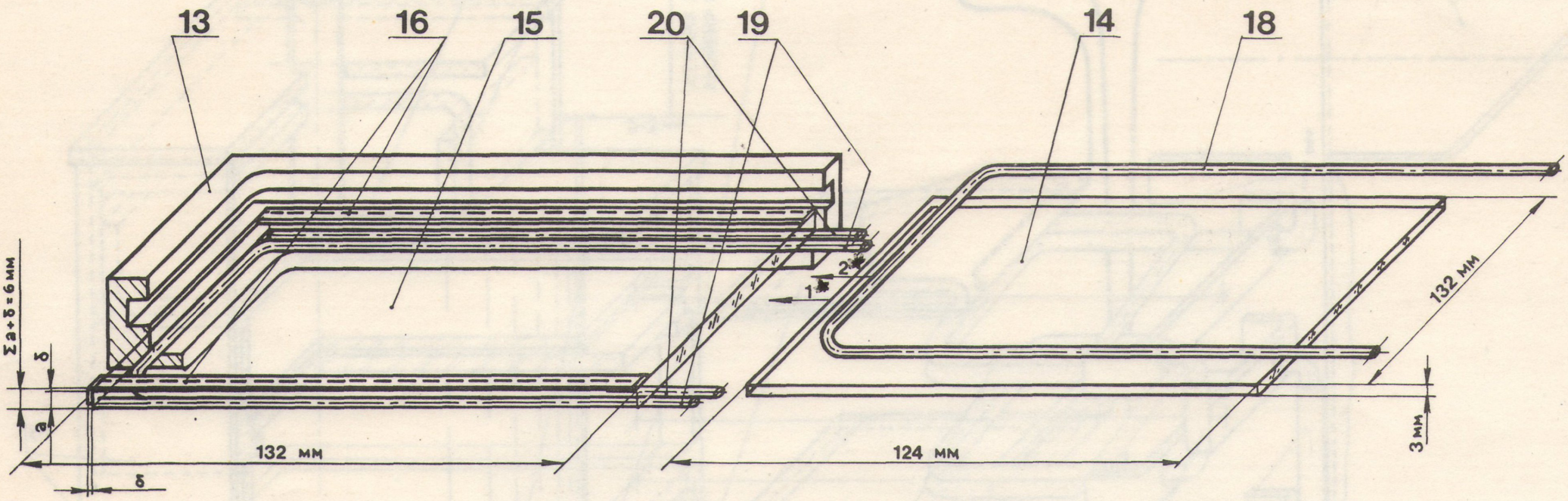
С претензиями по качеству отдельных элементов или некомплектности поставки прибора для электрофореза обращайтесь в экспериментальную лабораторию р/к «Хийу Калур». Неисправные по вине изготовителя детали могут быть заменены в течение 18 месяцев со дня продажи прибора.

АППАРАТ ДЛЯ ВЕРТИКАЛЬНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА



(РИС 1)

СБОРКА ГЕЛЕВОЙ ЯЧЕЙКИ



РАМА, ПОЗ. 13, УСЛОВНО ИЗОБРАЖЕНА В РАЗРЕЗЕ

(РИС. 2)

ГЕЛЕВАЯ ЯЧЕЙКА

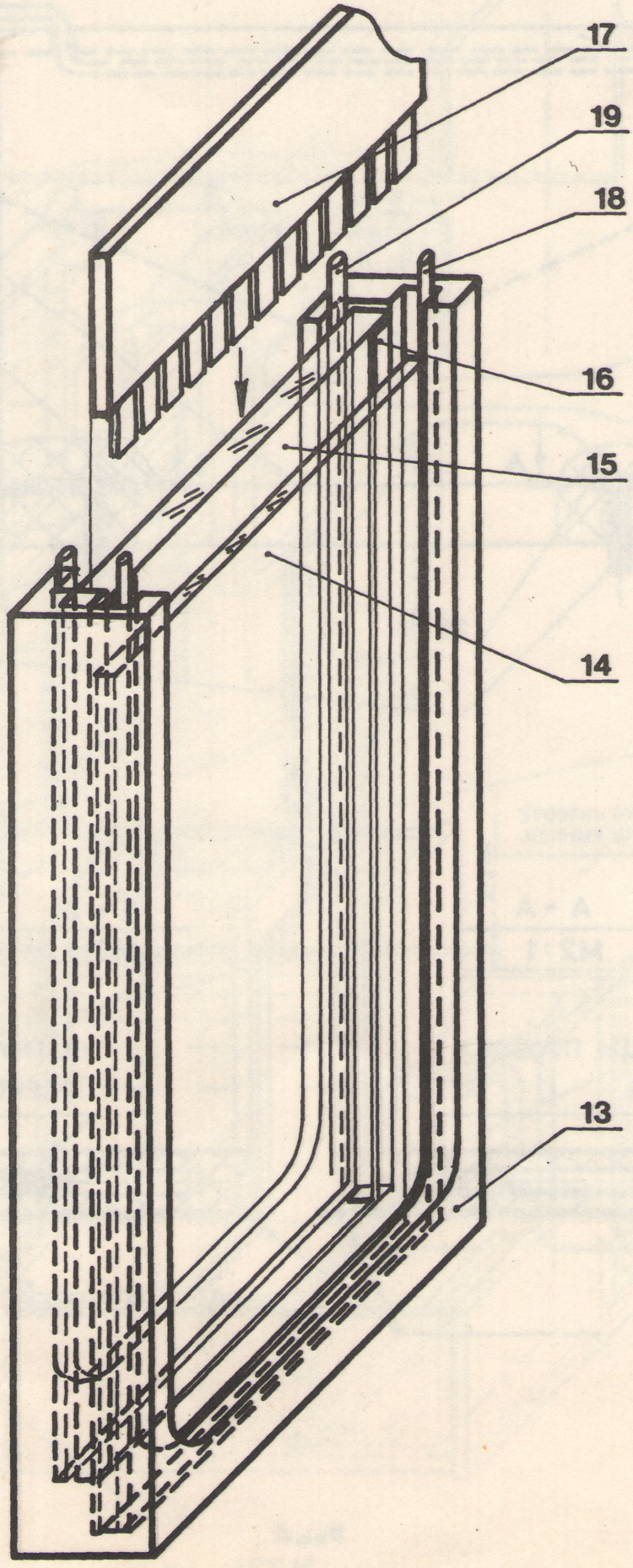
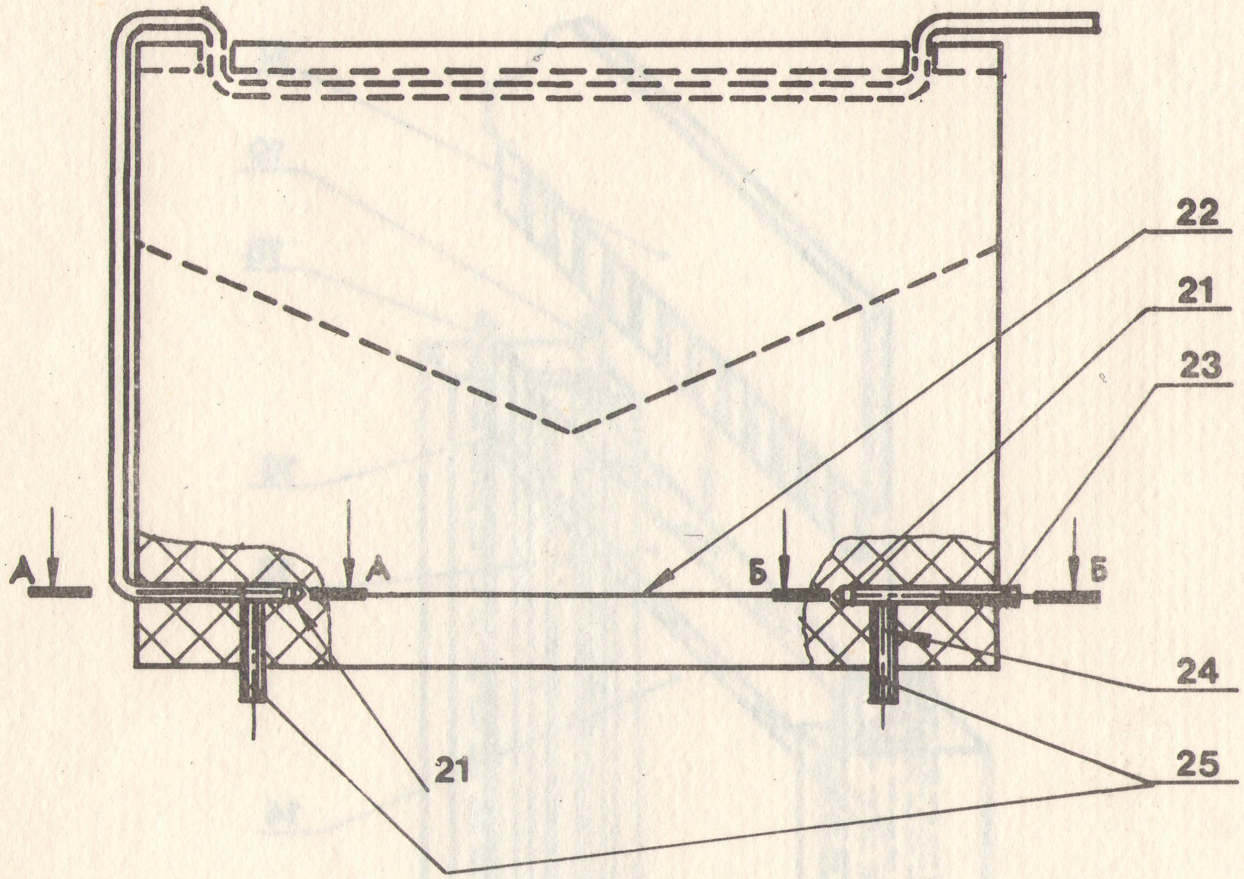


Рис.3

ЭЛЕКТРОДОДЕРЖАТЕЛЬ



А – А
М2 : 1

Б – Б
М2 : 1

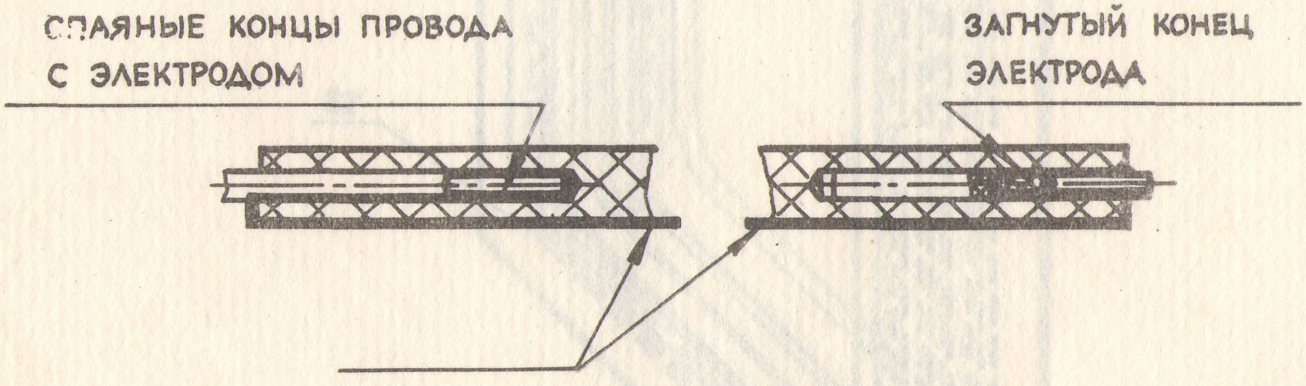


Рис. 4

РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ИСТОЧНИКИ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Э. Гааль, Г. Медьеши, Л. Верецкеи «Электрофорез в разделении биологических макромолекул», «Мир», М., 1982
2. Т. Дэвени, Я. Гергей «Аминокислоты, пептиды и белки», «Мир», М., 1976
3. Г. Маурер «Диск-электрофорез», «Мир» М., 1971
4. Л. А. Остерман «Методы исследования белков и нуклеиновых кислот», «Наука», М., 1981

«О». 605. 1000. 1984.